應用非酶切系統偵測單一核苷酸變異

農試所作物組 吳東鴻 陳昱蓉

一、前言

作物的育種未曾停歇，而選拔的方式與時俱進，傳統藉由外表型選拔所需時限較久，且生育狀態易受到環境條件變化而影響植株生長表現，需在田間種植較多重複數以確保選拔結果，會耗費較多時間及人力。分子標誌輔助選拔 (marker-assisted selection, MAS) 已是目前常用的技術，MAS只需在植株幼苗期取微量組織萃取DNA即可進行篩選，再將具有目標基因的植株移至田間，可減少田間種植面積，縮短育種年限，及早由雜交後裔中選拔出具有目標性狀的優良品系。

分子標誌主要是藉由兩親本間DNA序列中的差異作為辨別依據，較常見的運用有簡單重複序列 (Simple Sequence Repeat, SSR)、片段插入或缺失 (Insertion and Deletion, InDel)，及單一核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)，利用分子標誌擴增相同片段的序列，膠體電泳主要可辨別較大的片段差異，如SSR及InDel標誌多用膠體電泳進行分析，當膠體的密度越高時，可分辨差異越小的片段，目前技術約可分辨至5 bp的小片段差異。以水稻為例，秈稻及稉稻之間存有170萬個SNP，分布密度相當於每268 bp即有1個SNP變異，數量最為豐富，雖然不一定每個SNP都會造成胺基酸結構或基因功能的改變，但若能有效利用品種間的SNP，將可提高分子標誌的應用性。單一核甘酸的差異不是片段長度變異類型無法直接以膠體電泳判讀出差異，不過目前已有許多不同的方式可針對SNP進行分析；有別以往，本文將介紹運用較低成本，僅需藉由一般PCR反應與普通電泳設備即可針對已知的SNP進行篩選的應用技術，即稱為四引子 (Tetra-primer) 擴增阻滯突變系統 (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) 聚合酶鏈反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，可簡寫成T-ARMS PCR，為建構多元的基因型分析平台提供另一個選擇。

作　　者：吳東鴻助理研究員
連絡電話：04-23317106

二、單一核苷酸變異分析法原理介紹

針對SNP的分析，目前有許多不同的方法可選擇，以下將概略介紹數個常見的分析方式，大致可分為兩類，第一類是利用限制酵素酶切的方式，由於SNP無法直接透過電泳條帶判讀差異，可針對SNP位點設計專一性引子再由限制性酵素酶切，透過酶切的方式使PCR的擴增產物因SNP的差異而產生不同大小的條帶，讓SNP得以判讀，設計的方式可分為兩種：當SNP位點落於限制酵素切點上，該變異可以酶切擴增多型性 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAPS) 的設計方式進行，將SNP位點設計於正向引子 (forward primer) 及反向引子 (reverse primer) 間；若該SNP位點無適當的限制酵素時，則會利用衍生酶切擴增多型性 (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, dCaps)的方式設計標誌，利用人為的方式在引子序列創造一個適合限制酵素的切位，使SNP位點得以判讀差異；第二類即為非酶切系統中較常應用的方式，以螢光探針 (probe) 與SNP結合，如：TaqMan及KASP，以即時聚合酶連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain

表一、常用來分析SNP的四種方式比較表，可根據時間及成本考量選擇適合的分析方式

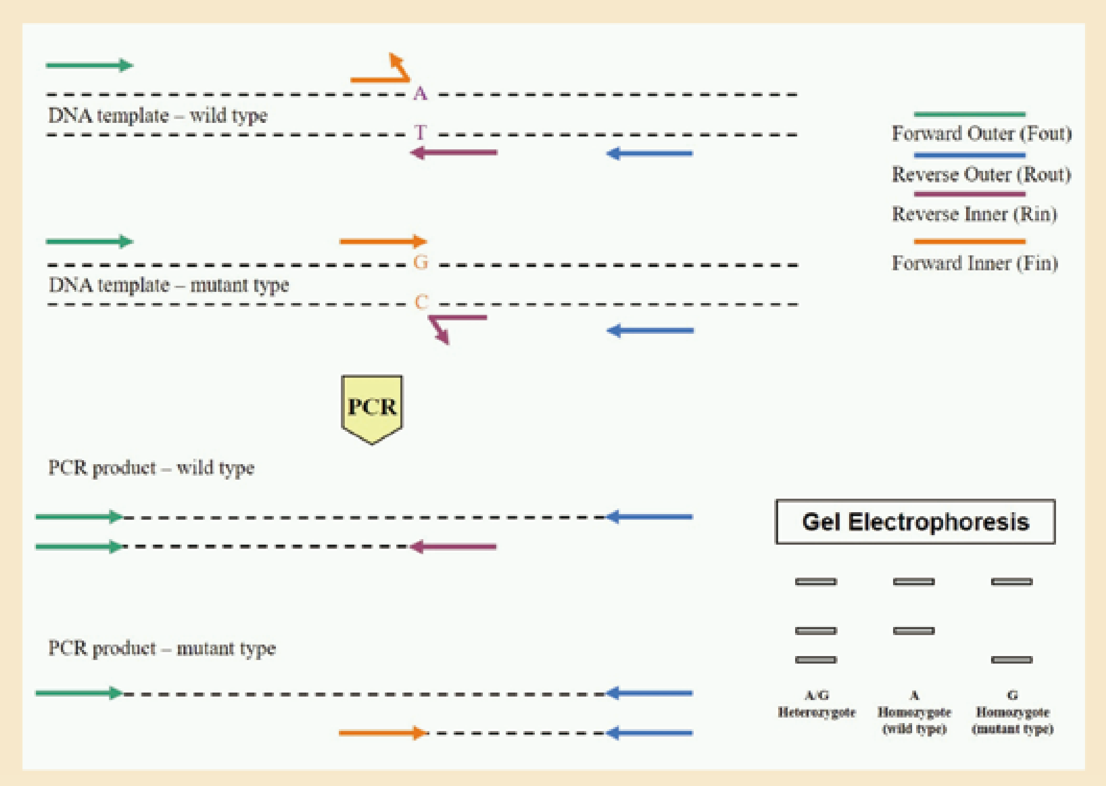
標誌種類	T-ARMS PCR	Caps/dCaps	KASP	TaqMan
設計原理	由一組內引子與一組外引子組成，將SNP位點設計在內引子上，透過等位基因特異性擴增可根據電泳結果分辨多型性。	由一組引子所組成，將SNP位點包含在PCR產物內或利用人為方式將SNP位點設計在引子上，PCR產物配合酵素酶切後經由電泳可得到分析結果。	屬於競爭性等位基因特異性擴增，由三條引子組成，其中兩條引子有SNP位點且有特定可標上螢光(HEX及FAM)的片段，利用引子競爭的方式判別SNP。	由一組外引子及一組探針組成，探針上標有螢光(VIC及FAM)，利用水解的方式激發螢光以判定SNP的種類。
適用機型	一般PCR，以96孔盤為例，單個樣品約0.5元。		Real Time PCR，以96孔盤為例，因為需要特殊光學封膜，單個樣品約1.9元。	
時間花費	約2小時	約4小時	約3小時	約40分鐘
引子花費	假設一條引子由20個鹼基組成，4條約800元，約可分析7,500個樣品，單樣品約0.1元。	假設一條引子由20個鹼基組成，2條約400元，約可分析7,500個樣品，單樣品約0.05元。	一組約2,700元，可作2,500反應，單樣品約1.1元。	因螢光標定在引子上，價格較高昂，一組約11,000元，約可分析1,500個樣品，單樣品約7.3元。
試劑花費	包含PCR master mix及電泳用Agarrose，單樣品約3元。	包含PCR master mix及電泳用Agarrose，單樣品約3元。	含螢光的master mix，一瓶25 mL可作5,000個反應，一瓶47,250元，單反應約9.5元。	一瓶10 mL約25,000元，可作2,000個反應，單反應約12.5元。
酵素花費	無	以MseI為例，單管14,800元，約可反應1667次，單反應約8.9元。	無	無
總　計	3.6元/樣品	12.45元/樣品	12.5元/樣品	21.7元/樣品

Reaction, Real-time PCR) 檢測基因上的SNP，藉由判讀螢光訊號以分辨SNP的種類。進一步，針對上述酶切與螢光偵測系統的設備門檻、檢測時間、耗材成本進行列表比較如表一，可知現行常見SNP分析方式尚缺乏低設備門檻、設計彈性高的檢測系統。

對此，本篇主要介紹的是T-ARMS PCR分子標誌，需在一個PCR反應中加入4條引子，包含2條正向引子及2條反向引子，而SNP會設計在內側 (inner) 的引子上，並利用倒數第三個鹼基錯配 (mismatch) 來提升擴增專一性，藉由引子組合產出不同大小的條帶，在嚴格的反應條件下可檢測目標SNP的多型性 (圖一)，屬於等位基因專一性擴增 (allele specific amplification) 且具有共顯性 (co-dominant)，因此可應用在雜交後裔的遺傳背景篩選。

三、Tetra-primer ARMS-PCR分子標誌設計流程

T-ARMS PCR的引子可經由 已知序列進行設計，在此介紹一個線上免費設計程式(http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html)，操作流程如下 (圖二)：



圖一、用於SNP基因分型的T-ARMS PCR引子擴增示意圖，以異質雜合體A/G做為範例。SNP分別設計在Rin與Fin上，並透過倒數第三個鹼基錯配來提高產物擴增的正確率，反應後會產生三種引子組合的產物，分別是不具特異性的Fout與Rout所產生的PCR產物、與普通型 (wild type) 相符的Fout與Rin的產物及突變型 (mutant type) 的Fin與Rout的產物，經由電泳分析後可明顯看出條帶差異。

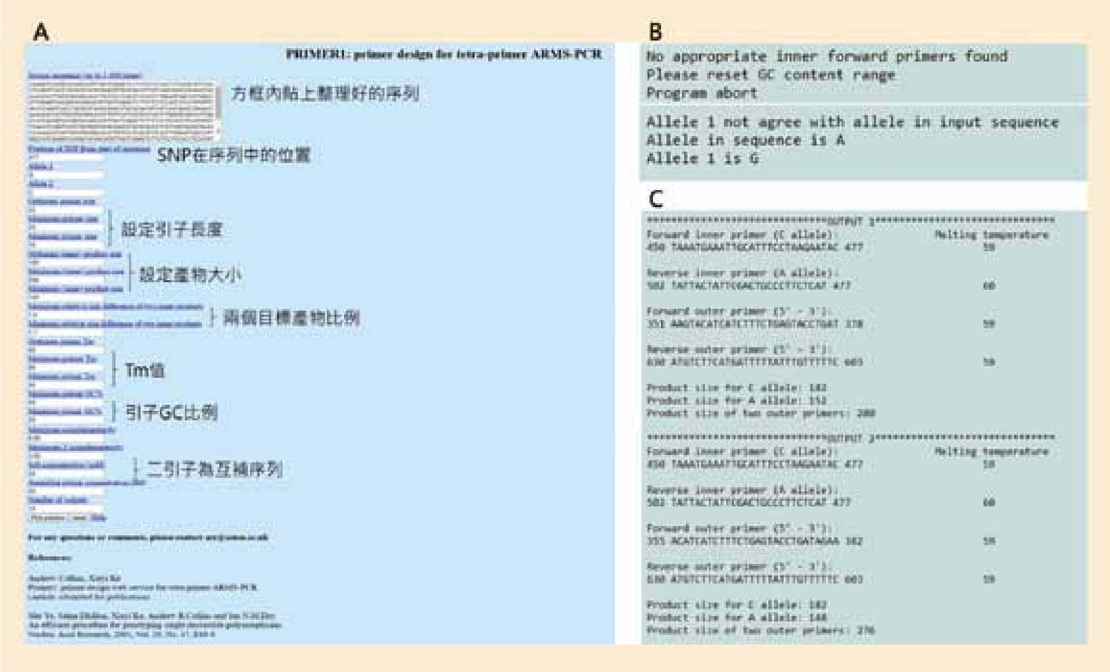
(一) 在大方框內貼上經序列比對軟體整理過之序列，最多可貼上1000 bp的序列，建議將SNP設定於序列中間的位置，在設計引子時兩端有最多的組數可選擇。

(二) 依照指示在下方鍵入序列中SNP的位置及變異核苷酸的種類 (A、T、C、G)。

(三) 設定預想的引子條件：引子長度、擴增產物大小、GC比例、黏合溫度 (Tm值) 等。引子長度設定在 18-25 個核苷酸，太長或太短都會影響黏合的效率、GC比例約占引子50%，GC的比例會影響Tm值，Tm值的高低會影響引子的專一性，且4條引子的Tm值須相近，才能得到最大的PCR效率。資料送出後若未得到結果，可能是引子條件設定太嚴苛，須重新調整後再送出；待條件設定符合後會顯現候選的引子對，包含引子的序列、Tm值、產物大小，可以依據需求進行選擇，可將引子下載至電腦內，並應用引子設計軟體 (Primer Premier) 進行微調，避免引子產生二次結構或稍微調整Tm值的差異，以增加PCR產物的專一性。

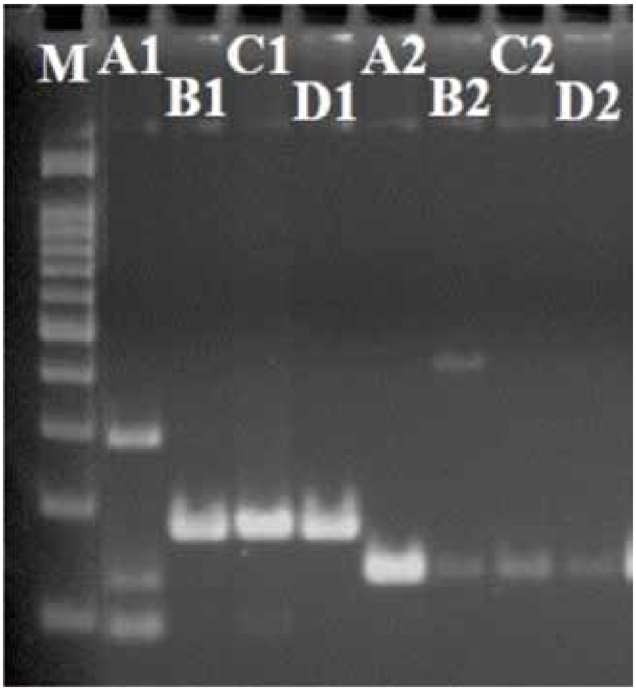
四、Tetra-primer ARMS-PCR分子標誌的應用

以水稻抗稻熱病基因為例，普通型於此位點為C，而突變型於此位點為T，該SNP導致胺基酸變異，使突變型產生抗病性，藉由此位點設計具專一性的功能性標誌，一般的PCR是由2條引子進行擴

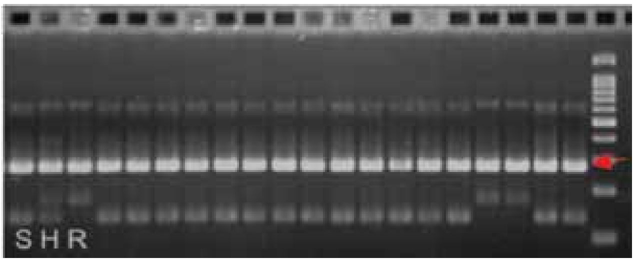


圖二、Tetra-primer ARMS-PCR分子標誌設計畫面。(A)主畫面，鍵入序列及條件，送出後可得到結果。(B)輸出失敗結果，若條件不符或輸入錯誤，系統會顯示須重設條件。(C)匯出結果，可選擇最適宜的條件。

增反應，T-ARMS PCR則需加入4條引子(Fin、Rin、Fout、Rout)，當PCR反應中加入越多引子時，越容易產生非目標條帶，因此在正式分析前須先進行引子測試，以兩兩一組的方式 (Fin+Rout，Fout+Rin) 測試PCR條件，如圖三所示，突變型材料的片段大小為185 bp，普通型則為137 bp，非目標基因型的引子組合則會產生非目標條帶，而外引子 (Fout+Rout) 產物則為278 bp (圖中未顯示)。當測試條件穩定後可對樣品進行分析，如圖四所示，該組引子可明顯區分兩種基因型及異質結合體。



圖三、引子對兩兩測試的結果。M為marker，A與B-D分別為4種樣品，A的基因型與其他3個相異，第1組為Fin+Rout引子，第2組為Fout+Rin引子，第1組A擴增出非目標產物，而處理2中的B-D皆有微弱目標條帶產生，兩兩測試可以確認引子對可擴增出目標產物，再進行後續的條件調整。



圖四、應用功能性分子標誌分析雜交後代之結果。突變型材料的片段大小為185 bp，普通型為137 bp，外引子(Fout+Rout) 產物為278 bp (紅色箭頭處)。

五、結語

隨著分子技術的快速發展，SNP的尋找與開發已不是問題，且SNP的密度之高，應用上會比序列的小片段差異靈活性高，如目前全基因組常見分析策略中的全基因組關聯分析 (Genome-Wide Association Study, GWAS)，只要蒐集一個族群的資料，就可迅速找出與目標基因具有高度相關的SNP位點，而後續的關聯性驗證作業或品種鑑別等技術開發，除了可利用目前較常見的螢光標定及酶切方式之外，本篇介紹的T-ARMS PCR提供了一個可以利用較低的成本及較快的速度進行分析及篩選，可供育種從業人員參考。

六、參考文獻

平嘉雲、吳東鴻、李長沛、賴明信，2012，運用酶切差異設計單一核苷酸多型性分子標誌，技術服務 91: 19-22。

戴宏宇、許育鳴，2017，應用分子標誌輔助選育高油酸落花生介紹，技術服務 110: 10-12